

544,212

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 8 月 19 日 (19.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/070046 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 19/28, C08B 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/001048
- (22) 国際出願日: 2004 年 2 月 3 日 (03.02.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-26609 2003 年 2 月 4 日 (04.02.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚化学株式会社 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒540-0021 大阪府 大阪市 中央区大手通 3 丁目 2 番 2 7 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 深江 博 (FUKAE, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒771-0193 徳島県 徳島市 川内町加賀須野 4 6 3 大塚化学株式会社研究技術センター内 Tokushima (JP).
- (74) 代理人: 田村 巖 (TAMURA, Iwao); 〒561-0872 大阪府 豊中市 寺内 1 丁目 9 番 2 2 号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SUGAR CHAIN ASPARAGINE DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法

(57) Abstract: A process for producing sugar chain asparagine derivatives from defatted egg yolk, which comprises: (a) a step in which defatted egg yolk is treated with a proteinase to produce a sugar chain peptide mixture; (b) a step in which the sugar chain peptide mixture is treated with a peptidase to produce a sugar chain asparagine mixture; (c) a step in which a lipid-soluble protective group is introduced into sugar chain asparagines in the sugar chain asparagine mixture to produce a sugar chain asparagine derivative mixture; and (d) a step in which the sugar chain asparagine derivative mixture is subjected to chromatography to separate it into sugar chain asparagine derivatives.

(57) 要約: 脱脂卵黄から糖鎖アスパラギン誘導体を製造する方法であって、(a)脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を製造する工程、(b)糖鎖ペプチド混合物をペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギン混合物を製造する工程、(c)糖鎖アスパラギン混合物中の糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入し糖鎖アスパラギン誘導体混合物を製造する工程、(d)糖鎖アスパラギン誘導体混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、を含む糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

WO 2004/070046 A1

## 明 細 書

## 糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法

## 5 技術分野

本発明は糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法に関する。

## 背景技術

近年、核酸（DNA）、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約60兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、ABO式血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせる要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造などの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

一方、脱脂卵黄より糖鎖アスパラギンが得られることは知られている（例えば特許文献1参照）。特許文献1によると、脱脂卵黄にアーモンドまたは杏種子を添加することにより従来よりも大量に糖鎖アスパラギンを得ている。しかし、こ

の方法で得られる糖鎖アスパラギンは純度が95%や92%であり、純粋な糖鎖アスパラギンを単離しているとはいえない。また、収量も脱脂卵黄100kgからダイシアリルオリゴ糖（11糖ジシアリルオリゴ糖）を29.5gあるいは27.2gとなっている。

- 5      また、鶏卵の可溶画分より抽出される糖ペプチド（SGP：シアリルグリコペプチド）より糖鎖アスパラギンが得られることも知られている。このSGPは、11個の糖残基からなる複合型糖鎖の還元末端に、アミノ酸6残基からなるペプチド鎖のアスパラギン残基が結合した化合物である。しかし、SGPは、たとえば、瀬古ら〔ビオケミカ   ビオフィジカ   アクタ（*Biochem. Biophys. Acta*）第1335巻、第23頁（1997）〕の方法によれば、鶏卵
- 10      黄1個から約8mgしか得られないことが示されている。

〔特許文献1〕国際公開WO96/02255号公報（請求項8及び請求項10）

- 15      本発明の目的は、医薬品開発等の分野において有用な種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明は、以下の発明に係る。

- 20      1. 脱脂卵黄から糖鎖アスパラギン誘導体を製造する方法であって、（a）脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を製造する工程、（b）糖鎖ペプチド混合物をペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギン混合物を製造する工程、（c）糖鎖アスパラギン混合物中の糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入し糖鎖アスパラギン誘導体混合物を製造する工程、（d）糖鎖アスパラギン
- 25      誘導体混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、を含む糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

2. 脱脂卵黄が鳥類の卵の卵黄を有機溶媒で脱脂処理することにより得られたものである上記の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

3. 糖鎖アスパラギン誘導体が 1 1 ~ 5 糖鎖アスパラギン誘導体である上記の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

5 4. 脂溶性の保護基がカーボネート含有基、アシル基、アリル基、F m o c 基あるいはB o c 基である上記の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

5. (b) で得られる糖鎖アスパラギン混合物に含まれる糖鎖アスパラギンを予め加水分解して一部糖残基を切断しておく上記の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

10 6. (c) で得られる糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を予め加水分解して一部糖残基を切断しておく上記の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、卵黄、たとえば、鳥類卵黄から得られる脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を得、次に  
15 ペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギンの混合物を得、次いでこの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入（結合）して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖  
20 鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン（A s n）の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、M a n (  $\beta$  1 - 4 ) G l c N a c (  $\beta$  1 - 4 ) G l c N a c を母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、  
25 「A c H N」はアセトアミド基を示す。

本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、具体的には、

(a) 脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を製造する工程、  
ならびに

(b) 糖鎖ペプチド混合物をペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギン混合物を  
製造する工程、ならびに

5 (c) 糖鎖アスパラギン混合物中の糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入し  
糖鎖アスパラギン誘導体混合物を製造する工程、ならびに

(d) 糖鎖アスパラギン誘導体混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アス  
パラギン誘導体を分離する工程、  
を含むものである。

10 以下、本発明の脱脂卵黄から糖鎖アスパラギン誘導体を得る製造方法を具体的に  
に説明する。

本発明に使用される脱脂卵黄とは、特に限定されるものではないが、例えば、  
鳥類の卵の卵黄（ニワトリ、ウズラ、アヒル、カモ、ハトなどの卵黄が好ましい。  
特に卵黄内に含まれる人型糖鎖アスパラギン、特に人型2分岐糖鎖アスパラギン  
15 の量からニワトリがよい。）を有機溶媒で脱脂処理したものがよい。このとき、  
有機溶媒としては、メタノール、エタノール、ジエチルエーテル等が好ましい。

(a) 工程としては、上記脱脂卵黄をタンパク質分解酵素によりタンパク質を  
切断し、脱脂卵黄に含まれる糖鎖ペプチド（糖鎖アスパラギンペプチド）の混合  
物を得る。このとき、使用するタンパク質分解酵素としては、例えば、プロナー  
20 ゼ（和光純薬社製）、オリエンターゼ（HBI社製）等、一般のものを使用する  
ことができる。

また、糖鎖ペプチドの混合物より糖鎖ペプチド以外の成分を公知の方法、たと  
えば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを用いた各種クロマトグラフィー  
や、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた精製法に従って除去する  
25 ことが好ましい。

(b) 工程としては、(a) 工程で得られた糖鎖ペプチドの混合物をペプチド

分解酵素によりペプチドを分解し、糖鎖ペプチドに含まれる糖鎖アスパラギンの混合物を得る。このとき、使用するペプチド分解酵素としては、例えば、アクチナーゼ等、一般のものを使用することができる。

また、糖鎖アスパラギンの混合物より糖鎖アスパラギン以外の成分を公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを用いた各種クロマトグラフィーや、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた精製法に従って除去することが好ましい。

また、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得るという観点から、さらに当該混合物に含まれる糖鎖アスパラギンを加水分解して一部糖残基を予め切断しておくのが好ましい。加水分解する方法としては酸を使用する方法あるいは酵素を使用する方法等がある。

前記酸としては特に限定するものではなく、たとえば、塩酸、硫酸、硝酸、トリフルオロ酢酸などの無機酸および有機酸、陽イオン交換樹脂、不溶性の固体試薬（シリカゲル等）などを使用することができる。また、酵素としては、糖加水分解酵素が好適であり、エンド型、エキソ型いずれの反応様式の酵素も使用することができる。かかる酵素としては特に限定されるものではなく、当該活性を有するものであれば、市販の酵素、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。

酵素反応は公知の条件に従えば良く、その際、反応の進行を薄層クロマトグラフィーで追跡し、化合物がもっとも多く得られるところで反応を適宜停止させればよい。

(c) 工程としては、(b) 工程で得られた糖鎖アスパラギンを含む混合物を用い、それに含まれる糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基の導入を行う。当該保護基としては特に限定されるものではなく、たとえば、9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）基やt-ブチルオキシカルボニル（Boc）基、アリルオキシカーボネート（Alloc）基等のカーボネート含有基、アセチル（A

c). 基等のアシル基、アリル基、ベンジル基等の保護基を使用することができる。合成の効率および次工程の分離精製の効率を考慮すると、好ましくは、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基やtert-ブチルオキシカルボニル (Boc) 基、アリルオキシカーボネート基等のカーボネート含有基、アセチル基等のアシル基がよい。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を直ちに所望の糖ペプチドの合成に使用できるという観点から、当該保護基としては、ペプチド合成に広く用いられるFmoc基またはBoc基が好ましく、なかでもFmoc基はシアル酸など比較的酸性条件に不安定な糖が糖鎖に存在する場合に特に有効であることからより好ましい。また、保護基の導入は公知の方法（たとえば、

10 Protecting Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）に従って行えばよい。

たとえば、Fmoc基を用いる場合、糖鎖アスパラギンを含む混合物に対しアセトン或いはDMFを適量加えた後、さらに9-フルオレニルメチルーN-スクシニミチルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて溶解し、25℃にてアスパラギン残基へのFmoc基の結合反応を行うことにより、当該糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基にFmoc基を導入することができる。

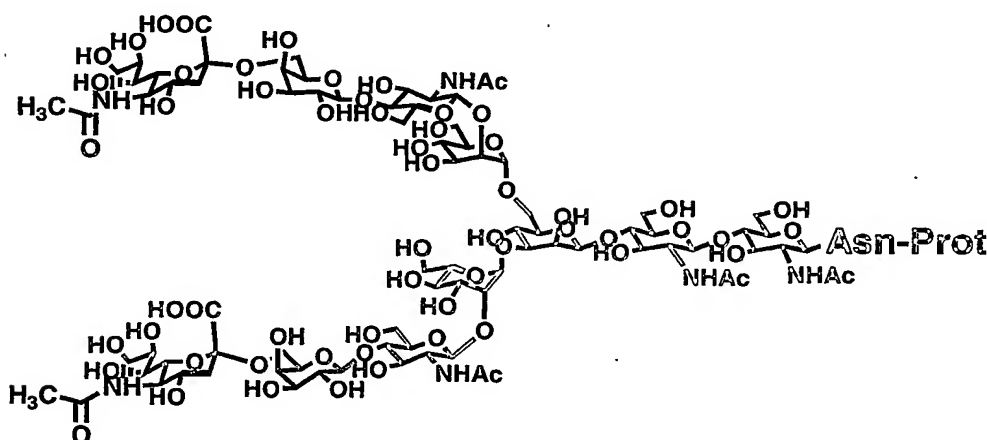
以上の操作により、脂溶性の保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物が得られる。

(d) 工程としては、(c) 工程で得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物を公知のクロマトグラフィー、特に分取型のクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体に分離する。なお、かかる工程においては、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物を直接使用することができるが、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得るという観点から、さらに当該混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解に供し、一部糖残基を予め切断して得られる糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を使用してもよい。なお、糖残基の切断の程度は前記同様である。また、加水分解は前記と同様にして行うことができる。

各糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独でまたは複数組み合わせるにより行うことができる。

たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア社製モノQカラム、イヤトロン社製イアトロビーズカラムなどが利用可能である。分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

上記で得られる糖鎖アスパラギン誘導体としては、例えば11～5糖鎖アスパラギン誘導体、好ましくは11～7糖鎖アスパラギン誘導体、更に好ましくは11～9糖鎖アスパラギン誘導体、特に好ましくは下記式で示される11糖鎖アスパラギン誘導体を挙げることができる。なお、式中のProtは保護基を示す。



さらに、分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解することにより、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。たと



例えば、糖鎖アスパラギン誘導体を分離する段階においては混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体の種類を制限して糖鎖アスパラギン誘導体を大まかに分離し、次いで加水分解、たとえば、糖加水分解酵素を用いて加水分解することにより所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。なお、加水分解は前記と同様にして行うことができる。特に、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をより効率的に得る観点から、糖残基の切断様式が明確な糖加水分解酵素を用いて加水分解するのが好ましい。

このように、各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、さらに各種糖加水分解酵素等を用いて当該誘導体を加水分解し、糖鎖の非還元末端の糖残基を除去することにより、たとえば、糖鎖の末端の分岐構造が不均一な様々な糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ単一化合物として得ることができる。また、種々の糖加水分解酵素を用い、加水分解する順番やその種類を変えることで、より多くの種類の糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

また本発明は、種々の単離された糖鎖アスパラギンを大量に得ることができる糖鎖アスパラギンの製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法に従う糖鎖アスパラギン誘導体の製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギン誘導体から保護基を除去する工程を含むものである。

糖鎖アスパラギン誘導体からの保護基の除去は、公知の方法に従って行うことができる（たとえば、Protecting Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）。たとえば、保護基がFmoc基である場合、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中、糖鎖アスパラギン誘導体にモルフォリンを加えて反応を行うことによりFmoc基を除去することができる。また、Boc基は弱酸を反応させることで除去することができる。保護基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製することにより、糖鎖アスパラギンを得てもよい。

また、保護基がベンジル基である場合、ベンジル基の除去は、公知の方法に従って行うことができる（たとえば、Protecting Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）。

さらに、糖鎖アスパラギンからのアスパラギン残基の除去は、公知の方法に従って行うことができる。たとえば、糖鎖アスパラギンを無水ヒドラジンと反応させた後、アセチル化することによりアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。また、糖鎖アスパラギンを塩基性水溶液で加熱還流後、アセチル化することによってもアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。アスパラギン残基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製してもよい。

このように、本発明によれば、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖（以下、3つ併せて糖鎖類という場合がある）を安価かつ効率的に大量に製造することができる。

かかる糖鎖類は医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、たとえば、ガンのワクチン合成があげられる。細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖鎖類を製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが可能である。また、本発明により得られる糖鎖類を、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導体化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

また、たとえば、糖タンパク質であるエリスロポエチン（EPO）が、その赤血球増殖能により貧血の治療薬として使われているが、このEPOは糖鎖が結合していないと活性がでないことが判明している。このように、タンパク質には糖

鎖の結合によって生理活性を発現するものがあるので、たとえば、糖鎖を結合させることができない大腸菌発現系によりタンパク質のみを大量に調製し、次いで所望の糖鎖構造を有する、本発明により製造した糖鎖を導入することにより生理活性の発現を付与したり、また、任意のタンパク質に種々の糖鎖構造を有する、

5 本発明により製造した糖鎖を導入することにより、新たな生理活性を有する新規な糖タンパク質を合成することも可能である。

また、天然の糖タンパク質に存在する糖鎖を本発明により製造した糖鎖と置換することにより新たな生理活性を付与することも可能である。糖タンパク質が有する糖鎖を本発明により得られた糖鎖と置換する技術としては、たとえば、P.

10 Sears and C. H. Wong, Science, 2001, vol291, p2344 ~2350に記載の方法をあげることができる。すなわち、糖タンパク質を $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ (E n d o -H) で処理してタンパク質表面のアスパラギン残基にはN-アセチルグルコサミン残基が1つだけ結合した状態にする。次いで、本発明により得られた糖鎖アスパラギン中の所望の糖鎖を $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダー

15 ゼ (E n d o -M) を用いて、前記N-アセチルグルコサミン残基に結合させるという方法があげられる。また、tRNAにN-アセチルグルコサミンを結合させておいて、大腸菌などの発現系を利用してN-アセチルグルコサミン残基を有する糖タンパク質を合成後、本発明により得られた糖鎖アスパラギン中の所望の糖鎖をE n d o -Mを用いて導入することも可能である。

20 また、現在、糖タンパク質を治療薬として利用する際の問題として、投与された糖タンパク質の代謝速度が速いことがあげられる。これは、糖タンパク質の糖鎖末端に存在するシアル酸が生体内で除去されると直ちに当該糖タンパク質が肝臓により代謝されることによる。そのため、ある程度の量の糖タンパク質を投与する必要がある。そこで、本発明により糖鎖の末端に除去されにくいシアル酸を

25 新たに組み込んだ糖鎖を製造し、対象タンパク質に当該糖鎖をE n d o -Mを利用して導入すれば、生体内での糖タンパク質の代謝速度を制御することが可能と

なり、投与する糖タンパク質の量を低くすることも可能である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。

##### 実施例 1

エタノール (E t O H) 6 7 m l を攪拌しているところに、卵黄 1 個を割り入れた。約 5 時間攪拌した後ろ過を行い、さらに E t O H 3 0 m l で洗浄を行った。得られた結晶に、再度 E t O H 8 3 m l を加え 1 晩攪拌を行った後ろ過を行い E t O H 3 0 m l で洗浄後、結晶を乾燥させると脱脂卵黄 (D e l i p i d a t e d E g g Y o l k) が約 3 g 得られた。

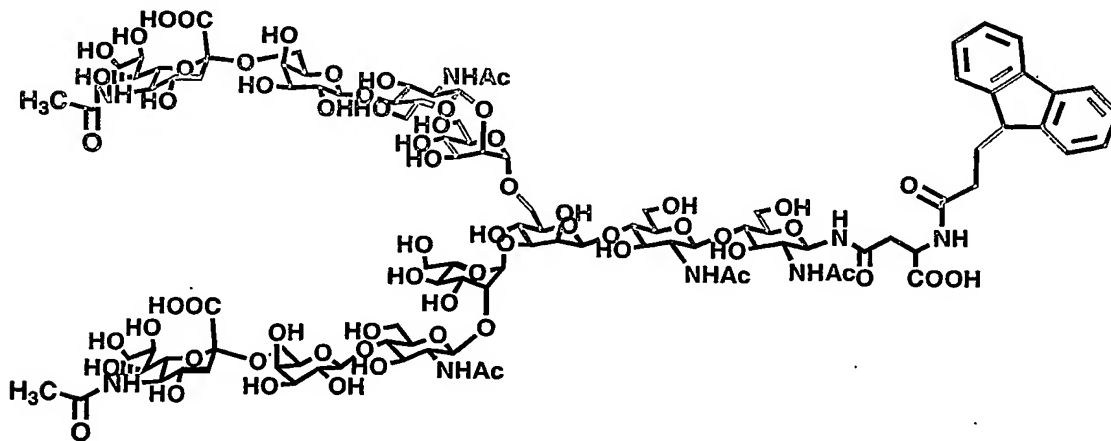
(a) このものを、りん酸緩衝液 (p H = 7 . 0 , 3 0 m l) に溶解させた後、N a N <sub>3</sub> (1 0 m g) を加えた。さらに、オリエンターゼ O N S (H B I 社製、1 . 0 g) を加え 5 0 ° C で約 2 4 時間静置させた。反応の終了を T L C にて確認した後、反応液をセライトにて濾過した。濾液を濃縮により減じ、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (S e p h a d e x G - 2 5 , 2 . 5 × 1 0 0 c m , H <sub>2</sub> O) で精製した。目的とする糖が含まれるフラクションを集めて濃縮、次いで凍結乾燥を行った。

(b) 得られた残留物 (約 4 3 0 m g) に、トリスー塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液 (p H = 7 . 5 , 4 3 m l) 、 N a N <sub>3</sub> (2 1 m g) を加え、溶解させた。このものに、アクチナーゼ E (4 3 m g) を加え 1 2 時間おきに p H をチェックしながら 2 4 時間静置させた。2 4 時間後、反応液に再度アクチナーゼ E 2 1 . 5 m g を加え、再び p H をチェックしながら約 4 8 時間反応させた。反応の終了を T L C で確認した後、セライトろ過を行い、濾液を濃縮で減じ、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (S e p h a d e x G - 2 5 , 2 . 5 × 1 0 0 c m , H <sub>2</sub> O) で精製した。目的とする糖が含まれるフラクションを集めて濃縮、次いで

凍結乾燥を行った。

(c) 得られた残留物 (約 120 mg) を、水 1.5 ml に溶かし、重炭酸ナトリウム 26 mg を加えた。ここに、Fmoc-Osu [N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl) oxysuccinimide] 68 mg を溶かしたジメチルホルムアミド 2.5 ml を加え、室温で 2 時間反応させた。原料消失を TLC (イソプロパノール : 1 M 酢酸アンモニウム水溶液 = 3 : 2) で確認後、エバポレーターを用いて濃縮した。残渣に、水 15 ml、ジエチルエーテル 25 ml を加えて 10 分間攪拌した後、分液操作を行った。さらに水層を、ジエチルエーテル 15 ml で洗浄した後、濃縮、凍結乾燥を行った。このものを、ODS カラム (ワコーゲル 100C18) を用い、グラディエントをかけ精製した。糖鎖が含まれている画分を集め、濃縮、ついで凍結乾燥を行った。

(d) この残留物を HPLC 分取カラムにて精製した (YMC-Pack R & D ODS, D-ODS-5-A, 20 × 250 mm, AN / 25 mM AcONH<sub>4</sub> buffer = 20 / 80, 7.5 ml / min., wave length ; 274 nm)。約 15 分後に出てくるメインのピークを分取後、濃縮、次いで ODS カラムにて脱塩処理を行った。凍結乾燥すると、目的とするジシアロ Fmoc 糖鎖誘導体が、約 13.3 mg 得られた。



得られた化合物の $^1\text{H}$ -NMRデータは以下のとおりである。

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C,  $\text{HOD}=4.81$ )

8.01 (2H, d,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.80 (2H, d,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.60 (2H, dd,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.5  
3 (2H, dd,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-  
H<sub>1</sub>), 5.09 (1H, d,  $J=9.4\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H<sub>1</sub>), 5.04  
(1H, s, Man4'-H<sub>1</sub>), 4.86 (1H, s, Man3-H<sub>1</sub>), 4.7  
0~4.66 (m, GlcNAc2-H<sub>1</sub>, GlcNAc5, 5'-H<sub>1</sub>), 4.5  
4 (2H, d,  $J=7.9\text{ Hz}$ , Gal6, 6'-H<sub>1</sub>), 4.44 (1H, d,  
10 FmocCH), 4.34 (1H, bd, Man3-H<sub>2</sub>), 4.29, (1H, b  
d, Man4'-H<sub>2</sub>), 4.20 (1H, bd, Man4-H<sub>2</sub>), 2.77 (2  
H, dd, NeuAc7, 7'-H<sub>3eq</sub>), 2.80 (1H, bdd, Asn-β  
CH), 2.62 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.14 (18H, s×6,  
-Ac), 1.80 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H<sub>3ax</sub>)

15

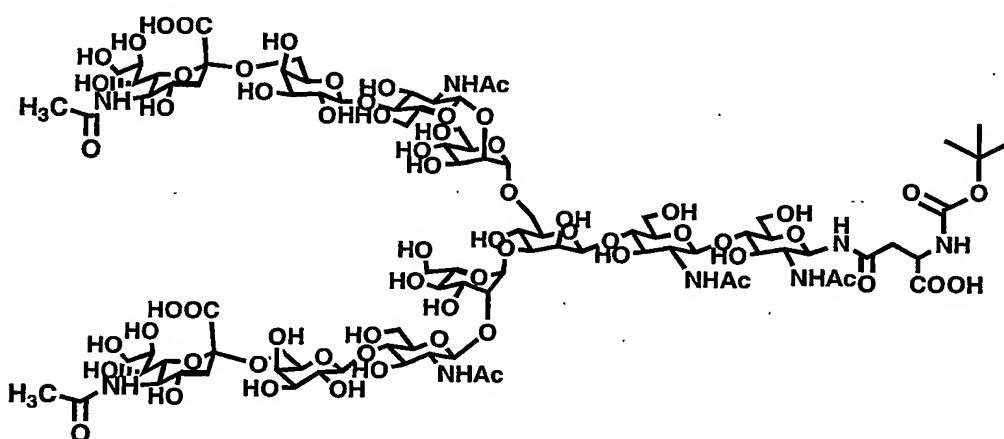
#### 実施例2 [ジシアロ糖鎖-Boc誘導体(11糖)]

(b) までは、実施例1と同様に行った。

(c) 得られた残留物(約120mg)を、0.1N NaOH aq. 1ml  
に溶解させた。ここに、(Boc)<sub>2</sub>O (4ml, 東京化成社製)を加え、室温  
20 で2時間反応させた。原料消失をTLC (イソプロパノール:1M 酢酸アンモ  
ニウム水溶液=3:2)で確認後、ジクロロメタン2.5mlを加えて分液を行  
った。水層をさらにジクロロメタン2.5mlで洗浄した後、40mM HCl  
にてpH=7.0に調整する。水層を濃縮後、ODSカラムにて精製を行う(グ  
ラジエント  $\text{H}_2\text{O}$  100% →  $\text{H}_2\text{O}/\text{AN}=99/1$  →  $\text{H}_2\text{O}/\text{AN}$   
25 =95/5 →  $\text{H}_2\text{O}/\text{AN}=90/10$ )。目的のジシアロ糖鎖Boc誘導  
体が含まれている画分(HPLCにて確認)を集め、濃縮、ついで凍結乾燥を行

った。

(d) この残留物をHPLCにて単離・精製を行った。(YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20×250mm, AN/25mM AcONH<sub>4</sub> buffer=5/95, 7.0ml/min., wave length; 215nm)。約11分後に出てくるメインのピークを分取後、濃縮、  
5 次いでゲルカラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, H<sub>2</sub>O) にて脱塩処理を行った。凍結乾燥すると、目的とするジシアロ糖鎖Boc誘導体が、約10.0mg得られた。



<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD=4.81)

δ 5.19 (s, 1H, Man4-H<sub>1</sub>), 5.12 (d, 1H, J=9.6, GlcNAc1-H<sub>1</sub>), 5.00 (s, 1H, Man4'-H<sub>1</sub>), 4.61-4.  
15 71 (m, 3H), 4.49 (d, 2H, J=7.6), 4.30-4.40 (bs, 1H, Asn-αCH), 4.31 (s, 1H, Man3-H<sub>2</sub>), 4.25 (bs, 1H, Man4-H<sub>2</sub>), 4.17 (bs, 1H, Man4-H<sub>2</sub>), 2.84 (dd, 1H, J<sub>a</sub>=15.6, J<sub>b</sub>=4.4, Asn-βCH), 2.72 (d, 2H, J<sub>a</sub>=12.4, J<sub>b</sub>=2.8, NeuAc7-H<sub>3<sub>ex</sub></sub>), 2.60-2.  
20 75 (m, 1H, Asn-βCH), 2.13, 2.12, 2.11 (each s,

1.8 H, Ac x 6), 1.77 (dd, 2H,  $J_a = 12.0$ ,  $J_b = 12.4$ , Ne u Ac 7-H<sub>3ax</sub>), 1.48 (s, 9H, Boc).

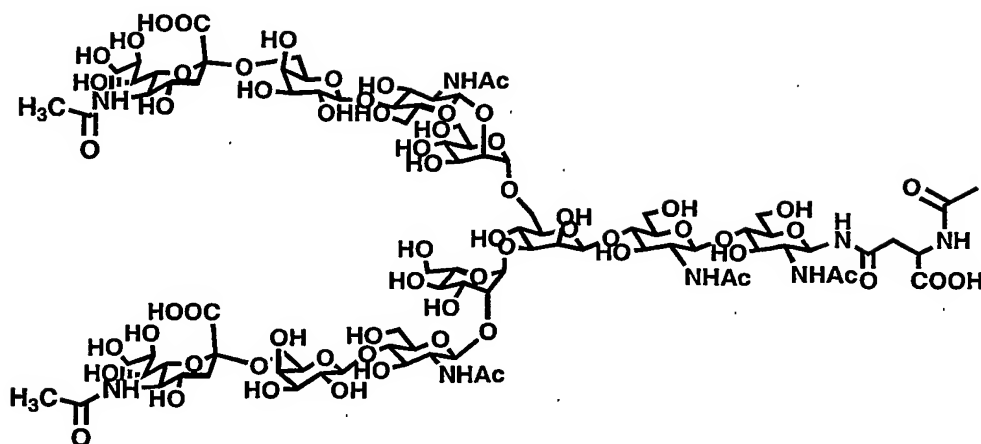
### 実施例3〔ジシアロー糖鎖Ac誘導体(11糖)〕

5 (b)までは、実施例1と同様に行った。

(c) 得られた残留物(約120mg)を、精製水1mlに溶解させた。このものにK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(72mg)を加え、さらに無水酢酸(99ml)を加え約2時間攪拌した。室温で2時間反応させた後、原料消失をTLC(イソプロパノール:1M 酢酸アンモニウム水溶液=3:2)で確認後、ジクロロメタン2.5  
10 mlを加えて分液を行った。水層をさらにジクロロメタン2.5mlで洗浄した後、sat. NaHCO<sub>3</sub> aq.にて、pH=7.0に調整した。水層を濃縮後、ODSカラムにて精製を行った(グラジエント H<sub>2</sub>O 100% → H<sub>2</sub>O/AN=99/1 → H<sub>2</sub>O/AN=95/5)。目的のジシアロー糖鎖Ac誘導体が含まれている画分(HPLCにて確認)を集め、濃縮、ついで凍結乾燥を  
15 行った。

(d) この残留物をHPLCにて単離・精製を行った。(YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20×250mm, AN/25mM AcONH<sub>4</sub> buffer=1/99, 7.0ml/min., wave length; 215nm)。約11分後に出てくるメインのピークを分取後、濃縮、  
20 次いでゲルカラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25, H<sub>2</sub>O)にて脱塩処理を行った。凍結乾燥すると、目的とするジシアロー糖鎖Ac誘導体が、約8.5mg得られた。





$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C,  $\text{HOD}=4.81$ )

$\delta$  5.19 (s, 1H, Man4- $\text{H}_1$ ), 5.11 (d, 1H,  $J=9.6$ ,  
 5 GlcNAc1- $\text{H}_1$ ), 5.00 (s, 1H, Man4'- $\text{H}_1$ ), 4.66 (b  
 s, 3H), 4.54-4.57 (dd, 1H,  $J_a=8.1$ ,  $J_b=4.5$ ), 4.  
 50 (d, 2H,  $J=7.8$ ), 4.31 (s, 1H, Man3- $\text{H}_2$ ), 4.25  
 (bs, 1H, Man4- $\text{H}_2$ ), 4.17 (bs, 1H, Man4- $\text{H}_2$ ), 2.  
 85 (dd, 1H,  $J_a=15.8$ ,  $J_b=4.3$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.65-  
 10 2.75 (m, 3H, NeuAc7- $\text{H}_{3_{\text{ex}}}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.13, 2.1  
 2, 2.08, 2.06 (each s, 21H, Acx7), 1.77 (dd, 2H,  
 $J_a=12.1$ ,  $J_b=12.1$ , NeuAc7- $\text{H}_{3_{\text{ax}}}$ ).

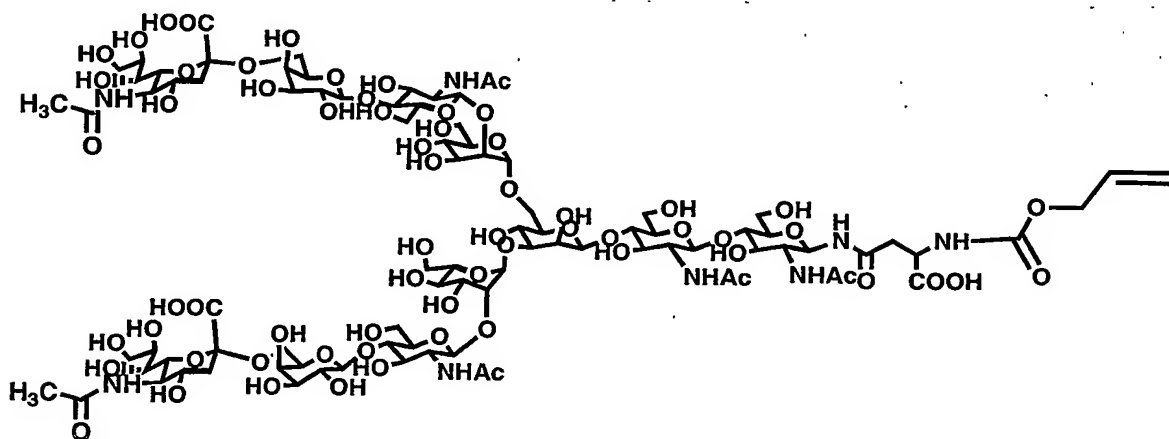
#### 実施例4 [ジシアロ糖鎖-A110c誘導体(11糖)]

15 (b)までは、実施例1と同様に行った。

(c)得られた残留物(約120mg)を、0.1N NaOH aq. 6mlに  
 溶解させた。ここに、(AllylOCO) $_2$ O (573ml, 東京化成社製)  
 を加え、室温で12時間反応させた。原料消失をTLC (イソプロパノール:1  
 M 酢酸アンモニウム水溶液=3:2)で確認後、ジクロロメタン12mlを加  
 20 えて分液を行った。水層をさらにジクロロメタン12mlで洗浄した後、40m

M HClにてpH=7.0に調整した。水層を濃縮後、ODSカラムにて精製を行った(グラジエント  $H_2O$  100%  $\rightarrow H_2O/AN=99/1 \rightarrow H_2O/AN=95/5$ )。目的のジシアロ糖鎖Allo誘導体が含まれている画分(HPLCにて確認)を集め、濃縮、ついで凍結乾燥を行った。

- 5 (d) この残留物をHPLCにて単離・精製を行った。(YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM,  $20 \times 250$  mm,  $AN/25$  mM  $AcONH_4$  buffer=2/98,  $7.5$  ml/min., wavelength; 215 nm)。約18分後に出てくるメインのピークを分取後、濃縮、次いでゲルカラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25,  $H_2O$ )  
 10 にて脱塩処理を行った。凍結乾燥すると、目的とするジシアロ糖鎖Allo誘導体が、約8.7 mg得られた。



- 15  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $D_2O$ , 30°C, HOD=4.81)  
 $\delta$  6.01 (ddd, 1H,  $J_a=17.2$ ,  $J_b=10.4$ ,  $J_c=5.2$ ,  $-CH_2-CH=CH_2$ ), 5.37 (d, 1H,  $J=17.2$ ,  $-CH_2-CH=CH_2$ ), 5.30 (dd, 1H,  $J_a=10.4$ ,  $J_b=1.6$ ,  $-CH_2-CH=CH_2$ ), 5.19 (s, 1H, Man4- $H_1$ ), 5.12 (d, 1H,  $J=9.6$ , GlcNAc1- $H_1$ ), 5.00 (s, 1H, Man4'- $H_1$ ), 4.60
- 20

5 -4.71 (m), 4.50 (d, 2H,  $J=7.6$ ), 4.35-4.45 (bm, 1H, Asn- $\alpha$ CH), 4.31 (s, 1H, Man3-H<sub>2</sub>), 4.25 (d, 1H,  $J=2.0$ , Man4-H<sub>2</sub>), 4.17 (d, 1H,  $J=2.4$ , Man4-H<sub>2</sub>), 2.87 (dd, 1H,  $J_a=15.6$ ,  $J_b=4.0$ , Asn- $\beta$ CH), 2.72 (bdd, 2H,  $J_a=12.4$ ,  $J_b=2.4$ , NeuAc7-H<sub>3ex</sub>), 2.64 (dd, 1H,  $J_a=15.6$ ,  $J_b=10.0$ , Asn- $\beta$ CH), 2.13, 2.12, 2.11, 2.08, 2.05 (each s, 18H, Acx6), 1.77 (dd, 2H,  $J_a=12.4$ ,  $J_b=12.0$ , NeuAc7-H<sub>3ax</sub>), 1.48 (s, 9H, Boc).

10

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、医薬品開発等の分野において有用な種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる。

## 請求の範囲

1. 脱脂卵黄から糖鎖アスパラギン誘導体を製造する方法であって、(a) 脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を製造する工程、(b)  
5 糖鎖ペプチド混合物をペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギン混合物を製造する工程、(c) 糖鎖アスパラギン混合物中の糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入し糖鎖アスパラギン誘導体混合物を製造する工程、(d) 糖鎖アスパラギン誘導体混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、を含む糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
- 10 2. 脱脂卵黄が鳥類の卵の卵黄を有機溶媒で脱脂処理することにより得られたものである請求の範囲第1項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
3. 糖鎖アスパラギン誘導体が11～5糖鎖アスパラギン誘導体である請求の範囲第1項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
4. 糖鎖アスパラギン誘導体が11～7糖鎖アスパラギン誘導体である請求の  
15 範囲第3項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
5. 糖鎖アスパラギン誘導体が11～9糖鎖アスパラギン誘導体である請求の範囲第4項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
6. 糖鎖アスパラギン誘導体が11糖鎖アスパラギン誘導体である請求の範囲第5項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
- 20 7. 脂溶性の保護基がカーボネート含有基あるいはアシル基である請求の範囲第1項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
8. 脂溶性の保護基がカーボネート含有基である請求の範囲第7項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
9. 脂溶性の保護基がFmoc基あるいはBoc基である請求の範囲第1項記  
25 載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
10. 脂溶性の保護基がFmoc基である請求の範囲第9項記載の糖鎖アスパラ

ギン誘導体の製造方法。

- 1 1. (b) で得られる糖鎖アスパラギン混合物に含まれる糖鎖アスパラギンを予め加水分解して一部糖残基を切断しておく請求の範囲第 1 項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
- 5 1 2. (c) で得られる糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を予め加水分解して一部糖残基を切断しておく請求の範囲第 1 項記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001048

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P19/28, C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P19/28, C08B37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI/BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTplus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | WO 03/008431 A1 (KAJIWARA Yasuhiro),<br>30 January, 2003 (30.01.03),<br>Page 15, line 1 to 22; page 16, line 25 to<br>page 17, line 14<br>& JP 2003-128703 A  | 1-12                  |
| X         | Inazu T., et al., Preparation of Fmoc-asparagine<br>derivatives having natural N-linked oligo<br>saccharide, and its application to the synthesis<br>of glycopeptides., Peptide Science, 1999,<br>Vol.1998, p.153-156 | 1-12                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing  
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means

"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 March, 2004 (24.03.04)

Date of mailing of the international search report  
06 April, 2004 (06.04.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12P19/28, C08B37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12P19/28, C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X               | WO 03/008431 A1 (KAJIWARA Yasuhiro)<br>2003.01.30, 第15頁第1~22行及び第16頁第25行~第17頁第14行<br>& JP 2003-128703 A   | 1-12             |
| X               | Inazu T, et al. Preparation of Fmoc-asparagine derivatives having natural<br>N-linked oligosaccharide, and its application to the synthesis of<br>glycopeptides.<br>Peptide Science, 1999, Vol.1998, p.153-156 | 1-12             |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.03.2004

国際調査報告の発送日

06.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448